

Aus dem Biochemischen Institut
der Universität Freiburg i. Br.
Direktor: Professor Dr. Helmut Holzer

Über die
Nicotinsäuremononucleotid-Pyrophosphorylase
(E.C. 2.4.2.11.) in Ehrlich-Ascites-Tumorzellen
und ihre Bedeutung für die durch alkylierende
Zytostatika hervorgerufene
Nicotinsäureamidadenindinucleotid-Senkung

Auszug aus der
Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg im Breisgau

vorgelegt von
Bernd Puschendorf
geboren in
Berlin
1966

Dekan: Professor Dr. Hans U. Zollinger
Referent: Professor Dr. Helmut Holzer



Digitized by the Internet Archive
in 2026



**Über den Einfluß von Trenimon
(2,3,5-Trisäthyleniminobenzochinon-1,4)
auf den NAD-Stoffwechsel
von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen***

H. GRUNICKE, E. RICHTER, M. HINZ**, M. LIERSCH, B. PUSCHENDORF**
und H. HOLZER

Biochemisches Institut der Universität Freiburg im Breisgau

Eingegangen am 27. April 1966

* Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. ERNST KLENK zum 70. Geburtstag gewidmet.

** Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden von M. HINZ und B. PUSCHENDORF der Medizinischen Fakultät der Universität Freiburg im Breisgau als Dissertation vorgelegt.

Trenimon at 10^{-4} M inhibits the biosynthesis of NAD by Ehrlich-ascites-tumorcells. At this concentration Trenimon causes in intact cells about a 50% decrease of the specific activity of NAD-pyrophosphorylase (E.C.2.7.7.1.) Addition of Trenimon to cell free extracts does not influence the activity of this enzyme. In Ehrlich-ascites-cells NAD-pyrophosphorylase catalyzes the synthesis of NAD from ATP and nicotinamide mononucleotide, as well as the synthesis of nicotinic acid adenine dinucleotide from ATP and nicotinic acid mononucleotide.

From calculation of NAD-turnover the rapid decrease in NAD content of tumor cells after treatment with Trenimon must be due to an increased rate of its destruction. This increased destruction is very probably caused by a release of the intracellular inhibition of NAD-glycohydrolase (E.C.3.2.2.5).

Lowering of the Trenimon concentration below 10^{-4} M leads to a rapid decrease in the amount of inhibition of NAD-biosynthesis. Below 2×10^{-5} M Trenimon no inhibition can be detected. An increased rate of destruction of NAD could still be measured with 4×10^{-6} M.

10^{-4} M Trenimon hemmt die Biosynthese von NAD in Ehrlich-Ascites-Tumorzellen. Bei dieser Trenimon-Konzentration erfolgt in intakten Zellen eine etwa 50%ige Erniedrigung der spezifischen Aktivität der NAD-Pyrophosphorylase (E.C. 2.7.7.1). Im zellfreien Extrakt ist Trenimon ohne Einfluß auf dieses Enzym. Die NAD-Pyrophosphorylase katalysiert in Ehrlich-Ascites-Tumorzellen sowohl die Synthese von NAD als auch diejenige von Nicotinsäure-Adenindinucleotid (NSAD) aus ATP und dem jeweiligen Mononucleotid.

Durch Messung des NAD-turnover konnte gezeigt werden, daß der rasche und starke Abfall des NAD-Gehaltes der Tumorzellen unter der Wirkung von 10^{-4} M

Abkürzungen. AMP = Adenosinmonophosphat; ARPPR = Adenosindiphosphat; ATP = Adosintriphosphat; NS = Nicotinsäure; NSA = Nicotinsäureamid; NSMN = Nicotinsäuremononucleotid; NMN = Nicotinsäureamidmononucleotid, NSAD = Nicotinsäureadenindinucleotid; NAD = Nicotinsäureamidadenindinucleotid; Rib-5-P = Ribose-5-phosphat; PRPP = 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat; PP = Pyrophosphat.

Trenimon nicht durch die Hemmung der Biosynthese des NAD erklärt werden kann. Der NAD-Abfall ist die Folge einer Abbaubeschleunigung. Ursache der Abbaubeschleunigung ist mit großer Wahrscheinlichkeit eine intracelluläre Deinhibierung der NAD-Glykohydrolase (E.C.3.2.2.5).

Bei Erniedrigung der Trenimon-Konzentration unter 10^{-4} M nimmt die Wirkung auf die NAD-Synthese schneller ab als der Einfluß auf den NAD-Abbau. Bei Trenimon-Konzentrationen unter $2 \cdot 10^{-5}$ M ist eine Synthesehemmung nicht mehr nachweisbar, eine Abbaubeschleunigung ist noch bei $4 \cdot 10^{-6}$ M Trenimon meßbar.

Einleitung

Carcinostatisch wirksame Äthylenimin- und N-Lost-Verbindungen bewirken eine Erniedrigung des NAD-Gehaltes von Tumorzellen [11, 13, 31].

Eine Alkylierung des NAD-Moleküls konnte als Ursache dieses NAD-Abfalles ausgeschlossen werden [32]. Zur Erklärung der Senkung des NAD-Spiegels unter der Wirkung der oben genannten alkylierenden Cytostatica kommt somit entweder eine Hemmung der Biosynthese oder eine Beschleunigung des NAD-Abbaues in Betracht.

Nach Untersuchungen von KRÖGER et al. [20] ist die Ursache des NAD-Abfalles eine Hemmung der Biosynthese. GREEN u. BODANSKI [5] sowie HILZ et al. [9] nehmen an, daß die Erniedrigung des NAD-Gehaltes die Folge einer Abbaubeschleunigung sei.

Eine Entscheidung der Frage, ob die Biosynthesehemmung oder eine Beschleunigung des Abbaues für die Senkung des NAD-Spiegels entscheidend ist, wird möglich, wenn das Ausmaß der Synthesehemmung und der NAD-turnover bekannt sind.

In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, welche Reaktion der NAD-Biosynthese in Ehrlich-Ascites-Tumorzellen durch das alkylierende Cytostaticum Trenimon gehemmt wird. Durch Messung des NAD-turnover wird geprüft, ob die Synthesehemmung den Abfall des NAD-Gehaltes in den Tumorzellen unter der Wirkung des Cytostaticums erklären kann.

Material und Methoden

Trenimon (2,3,5-Trisäthyleniminobenzochinon-1,4) wurde uns freundlicherweise von der Fa. Bayer AG, Leverkusen, überlassen. Nicotinsäureamidmononucleotid (NMN) wurde von der Fa. P. L. Biochemicals, Milwaukee/USA; 2-Desoxyglucose von der Fa. Calbiochem, Luzern/Schweiz; Nicotinsäure-7- ^{14}C (spez. Akt. 27,9 mC/mMol) und Nicotinsäureamid-7- ^{14}C (spez. Akt. 10,7 mC/mMol) von der Fa. Amersham, Buckinghamshire/England und Crotalus adamanteus Gift von der Fa. Sigma Chemical Company, St. Louis/USA, bezogen.

Die Gewinnung der Asciteszellen erfolgte wie früher beschrieben [6]. Nicotinsäure-adenin-dinucleotid (NSAD) wurde nach LAMBORG, STOLZENBACH u. KAPLAN [23] präpariert.

^{14}C -markiertes NSAD wurde durch Inkubation von Asciteszellen mit ^{14}C -Nicotinsäure in einem glutaminarmen Medium, bestehend aus 50% Krebs-Ringer-Biocarbonat-Puffer pH 7,4; 50% Ascitesserum und 5 mg/ml Glucose, gewonnen. Nach 1 Std Inkubation bei 37°C wurden die Zellen abzentrifugiert, mit eiskalter

HClO_4 (Endkonzentration 0,5 N) aufgeschlossen und das NSAD aus dem klarzentrifugierten Extrakt nach Zusatz von nicht markiertem NSAD als Träger mit Aceton gefällt. Der Niederschlag der Acetonfällung wurde in H_2O aufgenommen und das NSAD durch Ionenaustauschchromatographie an einer Dowex-1-Formiat-Säule, 8 X, 200—400 mesh, mit einem linearen Ameisensäuregradienten von 0—4 N isoliert.

Nicotinsäuremononucleotid (NSMN) wurde durch Spaltung von NSAD mit Phosphodiesterase aus *Crotalus adamanteus* Gift und anschließender *säulenchromatographischer* Isolierung gewonnen. Die Präparation der Phosphodiesterase folgte einer Vorschrift von KOERNER u. SINSHEIMER [18]. Zur Säulenchromatographie wurde das gleiche System wie zur Herstellung von ^{14}C -markiertem NSAD benutzt.

Isolierung der ^{14}C -markierten Pyridinnucleotide nach Inkubation der Asciteszellen mit ^{14}C -markierter Nicotinsäure oder ^{14}C -markiertem Nicotinsäureamid:

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (2 min bei $500 \times g$) vom Inkubationsmedium getrennt und mit dem gleichen Volumen 1 N HClO_4 aufgeschlossen. Der klarzentrifugierte Perchlorsäureextrakt wurde mit dem 6fachen Volumen -18°C Aceton versetzt. Nach 12 Std bei -18°C wurde der Niederschlag abzentrifugiert, einmal in Aceton gewaschen und in wenig Wasser aufgenommen. Ein Aliquot des in Wasser gelösten Niederschlages der Acetonfällung wurde zur Papierelektrophorese nach KRÖGER et al. [21] eingesetzt. Bei einer Spannung von 1200 V beträgt die Wanderungsgeschwindigkeit in Richtung zur Anode für NAD 6,5 cm/2 Std, für NSAD 11,5 cm/2 Std. Die Lokalisation von NAD und NSAD auf dem Pherogramm erfolgte nach der Lage mitgeführter identischer Vergleichssubstanzen. Die der Lage von NAD und NSAD entsprechenden Areale des Pherogramms wurden in 1×3 cm Streifen zerschnitten, die Streifen in Gläschen mit 10,0 ml Szintillatorflüssigkeit (4 g Diphenyloxazol, 100 mg 1,4-Bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)-benzol auf 1000 ml Toluol) getaucht und die Radioaktivität im Packard-Szintillationsspektrometer gemessen.

Zur Messung von ^{14}C -markiertem NMN und ^{14}C -markiertem NSMN wurden 0,05 ml des oben beschriebenen Perchlorsäureextraktes zur Papierchromatographie eingesetzt. Es wurde das von PREISS u. HANDLER [28] beschriebene System mit dem Solvens C benutzt. In diesem System betragen die R_F -Werte für NAD 0,17; für NSAD 0,15; für NMN 0,38; für NSMN 0,35. Eine Trennung von NMN und NSMN läßt sich durch Hochspannungselektrophorese 90° zur Laufrichtung des Chromatogramms in dem bei KRÖGER et al. [21] beschriebenen Puffersystem erreichen. Bei einer Spannung von 1200 V beträgt die Wanderungsgeschwindigkeit des NMN 6,8 cm/2 Std; des NSMN 13,6 cm/2 Std in Richtung zur Anode. Zur Lokalisation von NMN und NSMN auf dem Papier wurden identische Vergleichssubstanzen mitgeführt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte wie für ^{14}C -NAD bzw. ^{14}C -NSAD beschrieben.

Bestimmung von NAD

Die Asciteszellen wurden durch Zentrifugieren (2 min bei $500 \times g$) vom Inkubationsmedium getrennt und mit dem gleichen Volumen 1 N HClO_4 aufgeschlossen. Im klarzentrifugierten Extrakt wurde NAD im enzymatisch-optischen Test mit Alkoholdehydrogenase nach WARBURG u. CHRISTIAN [34] bestimmt.

Bestimmung von NSAD

Zur Messung der intracellulären NSAD-Gehalte wurden die Asciteszellen in Gegenwart von $7 \cdot 10^{-6}$ M Nicotinsäure (Endkonzentration $5 \cdot 10^{-6}$ M) so lange inkubiert, bis die Radioaktivität des NSAD/ml Zellen nicht weiter zunimmt. Da unter den von uns benutzten Inkubationsbedingungen die spezifische Radioaktivität über Nicotin-

säure im Medium konstant bleibt, ist in diesem Stadium die spezifische Radioaktivität des NSAD gleich derjenigen der eingesetzten Nicotinsäure. Unter Berücksichtigung der Zählausbeute läßt sich somit aus den $\text{IpM}_{\text{NSAD}}/\text{ml}$ Zellen die NSAD-Konzentration berechnen. Als Inkubationsmedium wurde das in der Legende zu Fig. 4 beschriebene benutzt. In diesem System wurden intracelluläre NSAD-Gehalte von 8–10 $\mu\text{Mol}/\text{ml}$ Zellen gemessen. Im Bereich von 10^{-6} – 10^{-4} M ist die Konzentration der Nicotinsäure im Medium ohne Einfluß auf den NSAD-Spiegel.

Messung der Enzymaktivitäten

a) *NSMN-Pyrophosphorylase (E.C.2.4.2.11)*. Ein Acetontrockenpulver aus Ehrlich-Ascites-Tumorzellen wurde 30 min bei $+4^{\circ}\text{C}$ mit der 10fachen Menge (g/v) 0,05 M Tris/HCl-Puffer pH 7,4 extrahiert und anschließend 30 min bei $12000 \times g$ zentrifugiert. Der klare Überstand wurde als Enzym eingesetzt. Der Testansatz (Gesamtvol. 1,0 ml) enthielt in μMol : PO_4^{3-} , pH 7,4, 50,0; MgCl_2 20,0; ATP 5,0; Nicotinsäure-7- ^{14}C 0,08; PRPP 0,2 und 0,5 ml Acetonpulverextrakt (ca. 13 mg Protein). Inkubation 20 min bei 37°C . Stop durch 1 min Erhitzen auf 100°C . Das ausgefallene Protein wurde abzentrifugiert und 0,05 ml des klaren Überstandes wie oben beschrieben zur Papierchromatographie und Bestimmung der Radioaktivität des gebildeten NSMN eingesetzt.

b) *NMN-Pyrophosphorylase (E.C.2.4.2.12)*. Eine 20% (v/v) Suspension von Ehrlich-Asciteszellen in 0,25 M Saccharose (0,02 M an Phosphatpuffer pH 7,4) wurde im Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert, das Homogenat 1 Std bei $10^5 \times g$ zentrifugiert und der klare Überstand als Enzym eingesetzt. Der Testansatz entspricht dem unter a) angegebenen mit der Ausnahme, daß statt Nicotinsäure 0,05 μMol Nicotinsäureamid-7- ^{14}C eingesetzt wurden. Die Messung des gebildeten NMN erfolgte wie unter a) beschrieben.

c) *NSAD-Pyrophosphorylase (E.C.2.7.7.1)*. Acetontrockenpulver aus Ehrlich-Ascites-Tumorzellen wurde mit der 10fachen (g/v) Menge 0,1 M Na_2HPO_4 30 min bei $+4^{\circ}\text{C}$ extrahiert, anschließend 10 min bei $12000 \times g$ zentrifugiert und der klare Überstand als Enzym eingesetzt. Der Testansatz enthielt in μMol : NSMN- ^{14}C (spez. Akt. 0,1 $\mu\text{C}/\mu\text{Mol}$) 0,25; ATP 5,0; MgCl_2 5,0; Tris/HCl pH 7,5 20,0; Enzymlösung 0,25 ml (ca. 9 mg Protein). Gesamtvolumen des Ansatzes 0,5 ml. Inkubation 20 min bei 37°C . Stop durch Zusatz von 0,05 ml 50% HClO_4 . Das ausgefallene Protein wurde abzentrifugiert und 0,05 ml des Überstandes zur Papierchromatographie und Bestimmung der Radioaktivität des gebildeten NSAD wie oben beschrieben eingesetzt.

d) *NAD-Pyrophosphorylase (E.C.2.7.7.1)*. Als Enzym diente der unter c) beschriebene Acetonpulverextrakt. Der Ansatz enthielt in μMol : NMN 1,0; ATP 10,0; MgCl_2 10,0; 5-Methyl-nicotinsäureamid 25,0; Tris/HCl, pH 7,4, 40,0. Enzymlösung 0,5 ml (ca. 18 mg Protein). Gesamtvolumen des Ansatzes 1,0 ml. Stop durch 1 min Erhitzen auf 100°C . Nach Zentrifugation Bestimmung des NAD im klaren Überstand im enzymatisch-optischen Test mit Alkoholdehydrogenase.

e) *NAD-Synthetase (E.C.6.3.5.1)*. Die Präparation des Enzyms erfolgte nach einer Vorschrift von BANDEL u. GRIMBERG [1]. Ehrlich-Asciteszellen werden im Verhältnis 1:2 (v/v) in 0,14 M KCl-Lösung (0,03 M an PO_4^{3-} pH 7,4; 0,01 M an MgCl_2) aufgenommen, durch zweimaliges Frieren und Tauen und anschließende Homogenisation im Potter-Elvehjem aufgeschlossen. Die Suspension wurde 1 Std bei $10^5 \times g$ zentrifugiert. Der klare Überstand wurde mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bis zur 0,45 Sättigung versetzt, das ausgefallene Protein abzentrifugiert, in wenig 0,05 M Tris/HCl-Puffer pH 7,4 aufgenommen und als Enzym eingesetzt. Der Ansatz enthielt in μMol : NSAD- ^{14}C 0,25 (spez. Akt. 0,3 $\mu\text{C}/\mu\text{Mol}$); ATP 5,0; MgCl_2 5,0; KCl 15,0; L-Glutamin 25,0; PO_4^{3-} , pH 7,4, 25,0. Enzymlösung 0,25 ml (ca. 5 mg Protein).

Gesamtvolumen des Ansatzes 0,5 ml. Inkubation 2 Std bei 37°C. Stop durch 1 min Erhitzen auf 100°C. Das ausgefallene Protein wurde abzentrifugiert und 0,05 ml des klaren Überstandes wie oben beschrieben zur Papierelektrophorese und Bestimmung der Radioaktivität des gebildeten NAD eingesetzt.

f) *Ribosephosphat-Pyrophosphokinase (E.C.2.7.6.1)*. Die Fähigkeit eines Extraktes PRPP zu synthetisieren wurde geprüft durch Messung der Synthese von NSMN aus Nicotinsäure, ATP und Ribose-5-Phosphat. Es wurde der unter a) beschriebene Ansatz benutzt mit der Ausnahme, daß an Stelle von PRPP 5 μ Mol Ribose-5-Phosphat eingesetzt wurden.

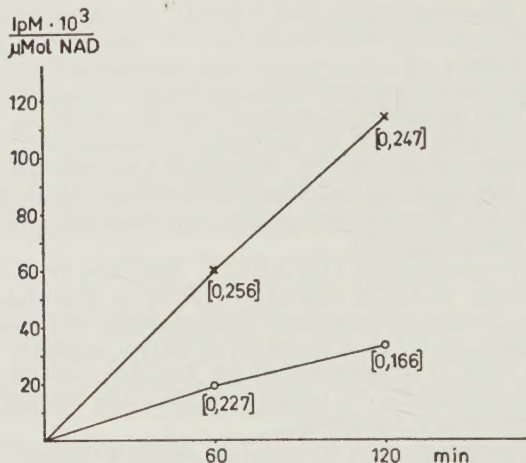


Fig. 1. Einfluß von Trenimon auf den Einbau von ^{14}C -Nicotinsäure in das NAD von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen bei Gegenwart von 5-Methyl-nicotinsäureamid. Die Zahlen in eckigen Klammern geben die NAD-Gehalte in $\mu\text{Mol/ml}$ Zellen an. $\times$ — $\times$ Kontrolle, $\circ$ — $\circ$ + Trenimon. 20% Zellsuspension in Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer pH 6,0 enthaltend (Endkonzentration): Glucose 5 mg/ml; Glutamin $3,7 \cdot 10^{-4}\text{M}$; 5 Methyl-nicotinsäureamid $5 \cdot 10^{-3}\text{M}$ und $9 \cdot 10^{-6}\text{M}$ ^{14}C -Nicotinsäure (spez. Akt. 10,7 mC/mMol). Der Ansatz + Trenimon enthielt zusätzlich $2,2 \cdot 10^{-4}\text{M}$ Trenimon. Inkubation 2 Std bei 37°C. Stop durch Abzentrifugieren der Zellen 2 min bei $500 \times g$. Aufschluß der Zellen mit kalter HClO_4 (Endkonzentration 0,5 N). Bestimmung und Isolierung von ^{14}C -NAD siehe unter Methoden

Ergebnisse

1. Einfluß von Trenimon auf die NAD-Synthese

Wie Fig. 1 zeigt, bewirkt Trenimon eine deutliche Hemmung des Einbaues von ^{14}C -markierter Nicotinsäure in das NAD. Um auszuschließen, daß die Synthesehemmung erst sekundär nach einem vorangegangenen NAD-Abbau als Folge eines dadurch verursachten ATP-Mangels eintritt, wurde der durch Trenimon bewirkte NAD-Abfall mit Hilfe von 5-Methyl-nicotinsäureamid verhindert. Wie die Fig. 1 zeigt, ist nach 60 min Inkubation in Gegenwart von Trenimon und 5-Methyl-nicotinsäureamid der NAD-Spiegel im Vergleich zu einer Kontrolle, die nur 5-Methyl-nicotinsäureamid, aber kein Trenimon enthielt, nur geringfügig verändert, während der Einbau von ^{14}C -Nicotinsäure auf ca. 50% erniedrigt ist.

Zur Lokalisation der Synthesehemmung wurde untersucht, welches Enzym der NAD-Synthese durch Trenimon beeinflusst wird. Die NAD-

Biosynthese in Ehrlich-Ascites-Tumorzellen erfolgt nach dem in Fig. 2 dargestellten Schema. Im Gegensatz zu den Befunden an Mikroorganismen [14], Erythrocyten [28], Rinder- und Rattenleber [15, 24] wird in den Asciteszellen ein beträchtlicher Teil des NAD ausgehend von Nicotinsäureamid über NMN synthetisiert [7]. Eine Nicotinsäureamid-Desamidase läßt sich nicht nachweisen [7]. Ein Einbau von Chinolinsäure in das

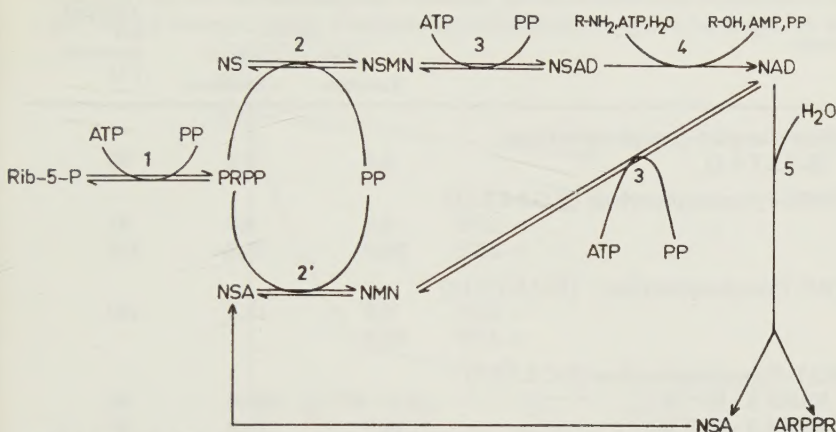


Fig. 2. Schema des NAD-Stoffwechsels in Ehrlich-Ascites-Tumorzellen. Verzeichnis der benutzten Abkürzungen siehe S. 60. Enzyme: 1 Ribosephosphat-pyrophosphokinase (E.C.2.7.6.1.); 2 NSMN-Pyrophosphorylase (E.C.2.4.2.11); 2' NMN-Pyrophosphorylase (E.C.2.4.2.12); 3 NAD-Pyrophosphorylase (E.C.2.7.7.1); 4 NAD-Synthetase (E.C.6.3.5.1); 5 NAD-Glykohydrolase (E.C.3.2.2.5)

NAD der Asciteszellen ist nicht meßbar [29]. Keine der in Fig. 2 dargestellten Reaktionen der NAD-Synthese wird im zellfreien Extrakt durch Trenimon gehemmt. Nach Vorinkubation intakter Zellen mit Trenimon sind jedoch nach Aufschluß der Zellen die Synthese von NAD aus NMN und ATP und die Bildung von NSAD aus NSMN und ATP deutlich herabgesetzt (Tab. 1). Es konnte gezeigt werden, daß die Synthesen von NAD und NSAD durch dieselbe Pyrophosphorylase katalysiert werden [7].

Ein verstärkter Abbau der Reaktionsprodukte oder der Substrate in dem als Enzym verwendeten Rohextrakt, der eine Erniedrigung der Enzymaktivität vortäuschen würde, konnte ausgeschlossen werden [10].

Die Konzentration von NSMN in Asciteszellen beträgt nach vorläufigen Messungen ca. $4 \cdot 10^{-6}$ M [30], diejenige für NMN ca. $6 \cdot 10^{-5}$ M [26]. Mißt man die NSAD- bzw. NAD-Pyrophosphorylase im Bereich der physiologischen NSMN- bzw. NMN-Konzentrationen (Tab. 1), so zeigt sich, daß die in Fig. 1 dargestellte Hemmung des Nicotinsäureeinbaues als Folge einer Hemmung der NSAD-Pyrophosphorylase erklärt werden kann. Eine Hemmung der Nicotinsäureamid-abhängigen NAD-Synthese scheint dagegen als Folge einer Hemmung der NAD-Pyrophosphorylase unwahrscheinlich, da die Aktivität dieses Enzyms auch nach Behandlung

Tabelle 1. Aktivität der Enzyme der NAD-Synthese in zellfreien Extrakten von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen nach Vorinkubation der Zellen mit Trenimon. Eine 20% Suspension von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen in Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer pH 6,0 (5 mg/ml Glucose enthaltend) wurde 1 Std bei 37°C in Gegenwart von $2,2 \cdot 10^{-4}$ M Trenimon inkubiert. Ein Parallelansatz ohne Trenimon diente als Kontrolle. Stop durch Abzentrifugieren der Zellen 2 min bei 500 $\times$ g. Bestimmung der Enzymaktivitäten siehe unter Methoden

Enzym	Aktivität in		Aktivität der Kontrolle (%)
	μMol		
	Std · ml Zellen		
	Kontrolle	+ Trenimon	
Ribosephosphat-pyrophosphokinase (E.C.2.7.6.1)	5,6	5,2	93
NSMN-Pyrophosphorylase (E.C.2.4.2.11)			
— ATP	9,9	8,0	81
+ ATP	32,0	37,2	115
NMN-Pyrophosphorylase (E.C.2.4.2.12)			
— ATP	8,9	11,4	130
+ ATP	27,2		
NSAD-Pyrophosphorylase (E.C.2.7.7.1)			
NSMN 5 · 10 ⁻⁴ M	1,0 · 10 ³	420,0	42
NSMN 5 · 10 ⁻⁶ M	18,0	10,8	55
NAD-Pyrophosphorylase (E.C.2.7.7.1)			
NMN 2 · 10 ⁻³ M	944,0	388,0	41
NMN 2 · 10 ⁻⁵ M	232,0	124,0	53
NAD-Synthetase (E.C.6.3.5.1)	21,8	24,2	112

mit Trenimon weit größer ist als diejenige der NMN-Pyrophosphorylase. Aus Versuchen von KRÖGER et al. [20] ist jedoch bekannt, daß Äthyleniminverbindungen auch eine Hemmung des Einbaues von Nicotinsäureamid in das NAD bewirken. Dieser Effekt kann dann als Folge einer Hemmung der NAD-Pyrophosphorylase erklärt werden, wenn man annimmt, daß die NMN-Konzentration infolge einer Kompartimentierung am Ort des Enzyms in der Größenordnung der NSMN-Konzentration liegt. Diese Annahme wird gestützt durch Versuche über den Einbau von Nicotinsäure und Nicotinsäureamid in das NAD von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen [7]. Die Untersuchungen ergaben, daß in Gegenwart der intracellulären Konzentrationen von Nicotinsäure und Nicotinsäureamid die NAD-Synthese über NSMN etwa ebenso groß ist wie diejenige über NMN. Da NSMN und NMN mit der gleichen Michaelis-Konstanten von $8 \cdot 10^{-5}$ M um dasselbe Enzymprotein konkurrieren [10], ist ein gleich schneller Umsatz dieser beiden Pyridinmononucleotide nur zu erklären, wenn am Ort des Enzyms die NMN-Konzentration in der Nähe der NSMN-Konzentration liegt.

2. Bestimmung des NAD-turnover

Die Fig. 3 zeigt den Einfluß von $2,2 \cdot 10^{-4}$ M Trenimon auf den NAD-Gehalt von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Der NAD-Gehalt fällt bei der benutzten Trenimon-Konzentration in 30 min auf 20% des Ausgangswertes ab.

Das in der Legende zu Fig. 3 beschriebene Inkubationsmedium unterscheidet sich von dem der vorangegangenen Versuche, bei denen ein saures Medium mit einem pH von 6,0 benutzt wurde. Äthyleniminverbindungen zeigen in der Regel im leicht

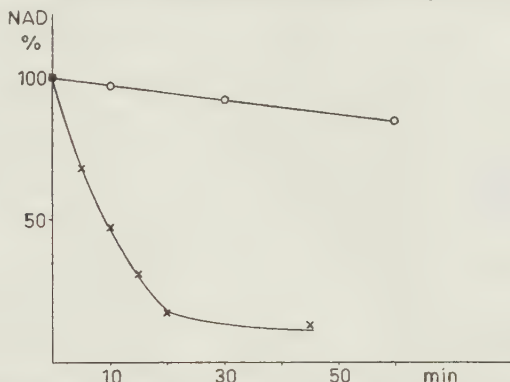


Fig. 3. Einfluß von Trenimon auf den NAD-Gehalt von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit $\times$ — $\times$. Die obere Kurve o — o zeigt den Einfluß einer vollständigen Hemmung der NAD-Biosynthese auf den NAD-Gehalt (theoretische Kurve berechnet aus dem in Abschnitt 2 ermittelten NAD-turnover). 1,0 ml Zellen wurden in 9,0 ml eines Mediums, bestehend aus Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer pH 7,4-Ascitessserum (1:1) suspendiert. Das Medium enthielt (Endkonzentrationen): Glucose 5 mg/ml; Glutamin $3,7 \cdot 10^{-3}$ M; Nicotinsäure $5 \cdot 10^{-3}$ M; Nicotinsäureamid $5 \cdot 10^{-3}$ M und Trenimon $2,2 \cdot 10^{-4}$ M. Inkubation unter Begasung mit 95% O_2 /5% CO_2 bei 37°C. Zu den angegebenen Zeiten wurde die Zelle durch 1 min Zentrifugieren bei $770 \times g$ vom Medium getrennt, mit 1,0 ml 1 N $HClO_4$ aufgeschlossen und NAD wie unter Methoden beschrieben bestimmt

sauren Milieu eine stärkere Wirkung als im neutralen oder schwach alkalischen [11]. Bei der hier verwandten hohen Trenimon-Konzentration ist die Geschwindigkeit des NAD-Abfalles in dem Krebs-Ringer-Medium von pH 6,0 jedoch nicht wesentlich größer als in dem oben beschriebenen, serumhaltigen Milieu von pH 7,4. Da die Zellen jedoch in dem serumhaltigen Medium einen sehr viel stärkeren Einbau von Nicotinsäure und Nicotinsäureamid in das NAD zeigen und nach mehrstündiger Inkubation morphologisch geringere Veränderungen zeigen als in dem reinen anorganischen Medium von pH 6,0, wurde für die nachstehenden turnover-Messungen das in der Legende zu Fig. 3 beschriebene Medium verwandt.

Wenn die in Fig. 3 dargestellte, rasche NAD-Senkung die Folge einer Biosynthesehemmung ist, dann muß das NAD einen sehr hohen turnover haben. Der NAD-turnover läßt sich messen als Summe der Geschwindigkeiten der NAD synthetisierenden Reaktionsfolgen.

Die Geschwindigkeit der Nicotinsäure-abhängigen NAD-Synthese wurde mit Hilfe von ^{14}C -Nicotinsäure nach dem von ZILVERSMIT et al. [35] angegebenen Verfahren bestimmt. Die Asciteszellen wurden mit ^{14}C -Nicotinsäure inkubiert und die spezifischen Radioaktivitäten von NSAD

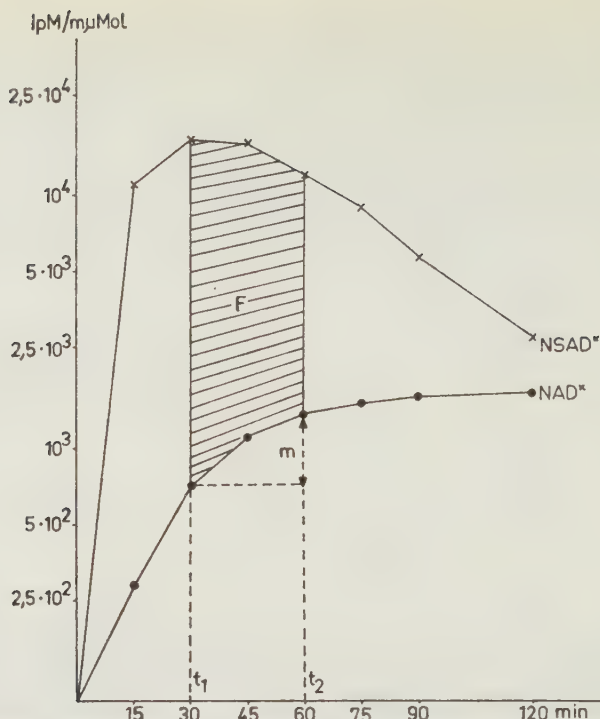


Fig. 4. Spezifische Aktivitäten von NSAD und NAD in Abhängigkeit von der Inkubationszeit nach Inkubation von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen mit ^{14}C -Nicotinsäure. 1,0 ml Zellen wurden in 9,0 ml eines Mediums, bestehend aus Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer pH 7,4-Ascitesserum (1:1) suspendiert. Das Medium enthielt (Endkonzentrationen): Glucose 5 mg/ml; Glutamin $3,7 \cdot 10^{-3}$ M; ^{14}C -Nicotinsäure (spez. Akt. 27,9 mC/mMol) $5 \cdot 10^{-6}$ M. Inkubation unter Begasung mit 95% O_2 /5% CO_2 bei 37°C . Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen durch Zentrifugation 1 min bei $770 \times g$ vom Medium getrennt und mit 1,0 ml kalter 1,0 N HClO_4 aufgeschlossen. Isolierung und Bestimmung von NSAD und NAD siehe unter Methoden

und NAD in Abhängigkeit von der Zeit gemessen (Fig. 4). Aus der Änderung der spezifischen Aktivitäten von NSAD und NAD in dem Zeitintervall $t_1 - t_2$ errechnet sich nach ZILVERSMIT et al. [35] unter der Bedingung, daß die Konzentrationen von NAD und NSAD konstant bleiben, die turnover-Zeit¹ als

$$T = \frac{\int_{t_1}^{t_2} \text{NSAD}^* \cdot dt - \int_{t_1}^{t_2} \text{NAD}^* \cdot dt}{\text{NAD}_2^* - \text{NAD}_1^*},$$

¹ Die biologische Umsatzgeschwindigkeit einer Substanz — die turnover-Rate (t_r) läßt sich definieren als $t_r = k \cdot GM$, wobei GM die Gesamtmenge der Substanz in dem zu untersuchenden System bedeutet [27]. Der Kehrwert von k : $\frac{1}{k} = \frac{GM}{t_r}$ wird als turnover-Zeit bezeichnet und entspricht dem bei radioaktiven Isotopen benutzten Begriff der mittleren Lebensdauer.

wobei NSAD* und NAD* die spezifischen Radioaktivitäten darstellen, Obige Gleichung gestattet eine graphische Lösung. Es ist nämlich $T = \frac{F}{m}$, wobei F die in Fig. 4 schraffierte Fläche ist, und m die in Fig. 4 eingetragene Strecke. In dem in Fig. 4 dargestellten Versuch ergibt sich für $T = \frac{F}{m} = \frac{412500}{600} \text{ min} = 11,5 \text{ Std.}$ Ein Mittelwert von sechs Wertepaaren aus F und m ergibt ein T von 10,95 Std, entsprechend einer turnover-Rate von ca. 30 μMol NAD pro Stunde bei einem NAD-Gehalt von 300–350 $\mu\text{Mol/ml}$ Zellen.

Tabelle 2. Einbau von ^{14}C -Nicotinsäureamid in die Pyridinnucleotide von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen. Es wurde der in der Legende zu Fig. 4 beschriebene Inkubationsansatz benutzt. Das Medium enthielt jedoch kein Glutamin und statt Nicotinsäure ^{14}C -Nicotinsäureamid (spez. Akt. 10,7 mC/mMol) in einer Endkonzentration von $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Die Zellmenge betrug in diesem Ansatz 0,2 ml bei einem Gesamtvolumen von 10,0 ml. Aufarbeitung der Zellen; Isolierung und Bestimmung der Pyridinnucleotide siehe unter Methoden

Zeit (Std)	^{14}C -NSA (extracellulär)	^{14}C -NSA (intracellulär)	^{14}C -NMN	^{14}C -NAD	NAD
	$\frac{\text{Ipm} \cdot 10^5}{\text{ml Medium}}$	$\frac{\text{Ipm} \cdot 10^5}{\text{ml Zellen}}$	$\frac{\text{Ipm} \cdot 10^4}{\text{ml Zellen}}$	$\frac{\text{Ipm} \cdot 10^5}{\text{ml Zellen}}$	$\frac{\mu\text{Mol}}{\text{ml Zellen}}$
1	6,6	6,6	3,5	1,7	358
2	—	7,2	12,0	5,4	358
2,5	—	7,3	10,0	6,2	385
3,0	6,6	6,6	—	—	—

Die Geschwindigkeit der Nicotinsäureamid-abhängigen NAD-Synthese läßt sich nicht nach dem oben angegebenen Verfahren messen, da die Reaktion $\text{NMN} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{NAD} + \text{PP}$ im Gegensatz zu der oben benutzten NAD-Synthetase-Reaktion in der Zelle auch in Richtung der NAD-Spaltung abläuft [16, 26]. Der Einbau von Nicotinsäureamid in das NAD wurde gemessen durch Verfolgung des Einbaues von ^{14}C -Nicotinsäureamid in die Metaboliten der Nicotinsäureamid-abhängigen NAD-Synthese. Bei den benutzten Inkubationsbedingungen läßt sich eine Markierung des NAD über die NAD-Glykohydrolase weitgehend ausschließen. Bedingungen, die zu einer Hemmung ATP- und PRPP-verbrauchender Reaktionen führen, ohne die NAD-Glykohydrolase zu beeinflussen, bewirken eine starke Erniedrigung des Nicotinsäureamid-Einbaues [7]. Eine Hemmung der NAD-Glykohydrolase um 99% vermag den Einbau von Nicotinsäureamid nicht wesentlich zu beeinflussen [7].

Tab. 2 zeigt das Ergebnis eines typischen Versuches. Es ist ersichtlich, daß die Radioaktivität des Nicotinsäureamids in den Zellen bereits bei der ersten Probennahme der Aktivität des Mediums entspricht und während der Dauer des Versuches nahezu konstant bleibt. Es ist daher möglich,

die spezifische Aktivität des eingebauten Nicotinsäureamids mit derjenigen des Mediums gleichzusetzen. Da die eingesetzte Zellmenge im Verhältnis zum Medium klein ist, führt der Verbrauch an Nicotinsäureamid nur zu einer geringfügigen Änderung der spezifischen Aktivität des ^{14}C -Nicotinsäureamids im Medium. Die Summe der in NMN und NAD eingebauten Mole Nicotinsäureamid ergeben unter der Voraussetzung, daß sich die Konzentrationen an NMN und NAD nicht ändern, die in dem Zeitintervall aus Nicotinsäureamid synthetisierten Mole NAD. Unter den in der Legende zu Tab. 2, beschriebenen Bedingungen werden bei einer spezifischen Radioaktivität des Nicotinsäureamids von $10,7 \mu\text{C}/\mu\text{Mol}$ und einer Zählausbeute von 49% ca. $25 \text{ m}\mu\text{Mole NAD/Std} \cdot \text{ml Zellen}$ aus Nicotinsäureamid synthetisiert.

Bei der von uns benutzten Versuchsanordnung, bei welcher die Inkubationsmedien Konzentrationen an Nicotinsäure und Nicotinsäureamid enthielten, die nach den vorliegenden Messungen [4, 9] den intracellulären Gehalten entsprechen, werden somit über den Nicotinsäure- und über den Nicotinsäureamid-abhängigen Weg insgesamt ca. $55 \text{ m}\mu\text{Mole NAD/Std} \cdot \text{ml Zellen}$ synthetisiert. Bei einem NAD-Gehalt von $300\text{--}350 \text{ m}\mu\text{Mol/ml Zellen}$ entspricht dies einer NAD-turnover-Zeit von $5,5\text{--}6,5 \text{ Std.}$

Theoretisch ist bei der von uns benutzten Methode zur turnover-Bestimmung ein Fehler möglich. Die Methode von ZILVERSMIT et al. [35] ergibt im vorliegenden Falle nur dann gültige Werte, wenn in dem Zeitintervall $t_1 - t_2$ ebenso viele Moleküle von NSAD zu NAD werden, wie von NAD abgebaut werden. Da NAD jedoch gleichzeitig aus NMN und ATP synthetisiert wird ($25 \text{ m}\mu\text{Mol/Std} \cdot \text{ml Zellen}$) ist bei einer gleichbleibenden NAD-Konzentration der NAD-Abbau größer als die Synthese über NSAD. Die im NAD meßbare Radioaktivität ist somit kein genaues Maß für die NAD-Bildung aus radioaktivem NSAD. Praktisch ist dieser Fehler jedoch ohne Bedeutung. Die nach Amidierung von markiertem NSAD pro Stunde und Milliliter Zellen syntetisierten $30 \text{ m}\mu\text{Mol}$ radioaktives NAD werden in dem NAD-Pool von $300\text{--}350 \text{ m}\mu\text{Mol/ml Zellen}$, von dem $80\text{--}85\%$ cytoplasmatisches NAD ist [2], stark verdünnt. Ein NAD-Abbau von $55 \text{ m}\mu\text{Mol/Std} \cdot \text{ml Zellen}$ entfernt daher nur maximal 10% der eingebauten Radioaktivität mehr aus dem NAD als ein Abbau von $30 \text{ m}\mu\text{Mol/Std} \cdot \text{ml Zellen}$. Dieser Verdünnungseffekt des NAD-Pools gestattet es auch bei Markierungsversuchen bis zu einer Dauer von etwa 2 Std eine Wiederverwendung des aus dem NAD-Abbau freiwerdenden Nicotinsäureamids zu vernachlässigen.

Bei Kenntnis der turnover-Zeit des NAD läßt sich leicht errechnen, welchen Einfluß eine vollkommene Hemmung der NAD-Synthese auf den NAD-Spiegel haben würde (vgl. obere Kurve in Fig. 3). Vergleicht man den NAD-Abfall, der bei einer vollständigen Hemmung der Synthese zu

erwarten ist, mit demjenigen unter der Wirkung von $2,2 \cdot 10^{-4}$ M Trenimon (Fig. 3), so ist ersichtlich, daß die Ursache der NAD-Senkung durch Trenimon nicht eine Biosynthesehemmung sein kann.

Der geringe Einfluß einer Biosynthesehemmung auf den NAD-Spiegel läßt sich experimentell zeigen durch Inkubation der Zellen in Gegenwart von 2-Desoxyglucose. Wie Tab. 3 zeigt, hemmt diese Substanz den Einbau von Nicotinsäure und Nicotinsäureamid in das NAD zu 80–90%.

Tabelle 3. Einfluß von Trenimon und 2-Desoxyglucose (2-DOG) auf den NAD-Gehalt und den Einbau von ^{14}C -Nicotinsäure (^{14}C -NS) und ^{14}C -Nicotinsäureamid (^{14}C -NSA) in das NAD von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen. Es wurden die in den Legenden zu Fig. 4 und Tab. 2 beschriebenen Inkubationsansätze benutzt. Die Ansätze mit 2-DOG enthielten $7,5 \cdot 10^{-3}$ M 2-DOG und $2,5 \cdot 10^{-3}$ M Glucose. Die Endkonzentration an Trenimon betrug $2,2 \cdot 10^{-4}$ M. Inkubation 20 min bei 37°C unter Begasung mit 95% O_2 /5% CO_2 . Isolierung und Bestimmung der Pyridinnucleotide siehe unter Methoden

Inkubation mit	Zusatz von	Ipm der Pyridinnucleotide		NAD Ipm	NAD $\frac{\text{m}\mu\text{Mol}}{\text{ml Zellen}}$	%
		ml Zellen · Std	%	$\frac{\text{m}\mu\text{Mol}}{\text{m}\mu\text{Mol}}$	$\frac{\text{m}\mu\text{Mol}}{\text{ml Zellen}}$	
^{14}C -NS	—	$34,0 \cdot 10^4$	100		322	100
^{14}C -NS	2-DOG	$3,4 \cdot 10^4$	10		306	95
^{14}C -NSA	—	$44,0 \cdot 10^4$	100		325	100
^{14}C -NSA	2-DOG	$9,4 \cdot 10^4$	21		309	95
^{14}C -NS	—	$59,0 \cdot 10^4$	100	1070	326	100
^{14}C -NS	Trenimon	$14,6 \cdot 10^4$	25	1160	55	17

Die Permeabilität der Zellmembran für Nicotinsäure und Nicotinsäureamid wird durch 2-Desoxyglucose nicht verändert [26]. Nach 30 min Inkubation in Gegenwart von 2-Desoxyglucose ist der NAD-Gehalt der Zellen nur geringfügig abgesunken. Unter der Wirkung von Trenimon, das eine geringere Hemmung der NAD-Synthese bewirkt, ist das NAD jedoch in derselben Zeit auf 17% des Ausgangswertes abgefallen.

3. Einfluß von Trenimon auf ^{14}C -markierte Metabolite des NAD-Stoffwechsels

Wie die in Fig. 3 und Tab. 3 dargestellten Versuchsergebnisse zeigen, bewirkt Trenimon eine Beschleunigung des NAD-Abbaues. Da Inhibitoren der NAD-Glykohydrolase (E.C.3.2.2.5) den Abfall des NAD-Gehaltes unter der Wirkung von Trenimon verhindern können [22], war eine Aktivierung dieses Enzyms anzunehmen. Diese Annahme wird gestützt durch die in Fig. 5 dargestellten Befunde. Fig. 5 zeigt den Einfluß von Trenimon auf Metabolite des NAD-Stoffwechsels, die durch Vorinkubation der Zellen mit ^{14}C -Nicotinsäure radioaktiv markiert sind.

Im Vergleich zu einer Kontrolle bewirkt Trenimon einen Abfall der Radioaktivität des NAD auf 10% und einen Anstieg der Aktivität des Nicotinsäureamids auf über 800%. Im Gegensatz dazu ist die Radioaktivität des NSAD nahezu unverändert, während diejenige des NSMN auf etwa 50% abgefallen ist. Nach einer Markierung mit ^{14}C -Nicotinsäure kann radioaktives Nicotinsäureamid nur aus dem NAD-Abbau stammen.

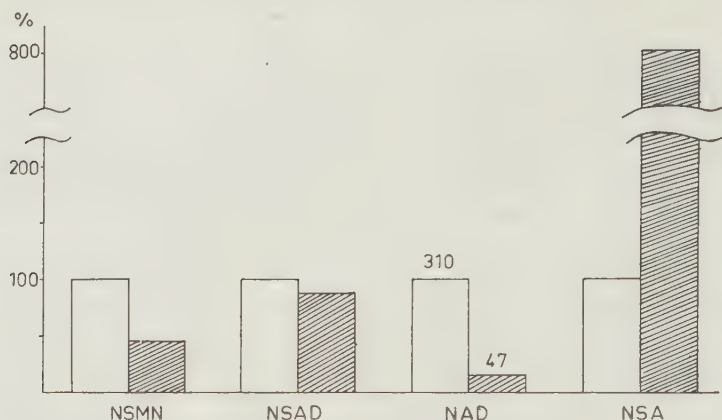


Fig. 5. Einfluß von Trenimon auf ^{14}C -markierte Metabolite des NAD-Stoffwechsels in Ehrlich-Ascites-Tumorzellen. Angaben in IpM/ml Zellen in Prozent der Kontrolle. + Trenimon schraffiert. Die Zahlen über den NAD-Säulen geben die NAD-Gehalte in $\mu\text{Mol/ml}$ Zellen an. Ascitestragenden Mäusen wurden $2,8 \mu\text{C}$ ^{14}C -Nicotinsäure (spez. Akt. $29,7 \mu\text{C}/\mu\text{Mol}$) i.p. appliziert. Nach 3 Std wurde der Ascites entnommen, durch Zentrifugation vom Serum getrennt, zweimal in Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer pH 6,0 gewaschen und anschließend in vitro jeweils mit und ohne Trenimon (Endkonzentration $2,2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) 30 min inkubiert. Es wurde der in der Legende zu Tab. 1 beschriebene Inkubationsansatz benutzt. Isolierung der Pyridinnucleotide und Messung der Radioaktivität siehe unter Methoden. Die Isolierung von Nicotinsäureamid erfolgte durch Chromatographie und Elektrophorese 90° zur Laufrichtung des Chromatogramms wie bei der Isolierung von NMN und NSMN beschrieben

Freies Nicotinsäureamid entsteht bei der Spaltung des NAD durch die NAD-Glykohydrolase. Die in Fig. 5 dargestellten Befunde entsprechen somit weitgehend denjenigen, die bei einer Aktivierung der NAD-Glykohydrolase zu erwarten sind.

Die Erniedrigung der Radioaktivität des NSMN wird durch die Annahme einer Aktivierung der NAD-Glykohydrolase nicht erklärt. Sie steht scheinbar auch in Widerspruch zu den in Tab. 1 mitgeteilten Befunden, nach denen $2,2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ Trenimon eine Hemmung der NSAD-Pyrophosphorylase bewirkt. Bei einer Inhibierung der NSAD-Pyrophosphorylase wäre jedoch ein Anstieg der Aktivität über NSMN und ein Abfall der Aktivität über NSAD zu erwarten. Im Gegensatz zu den in Tab. 1 beschriebenen Untersuchungen an zellfreien Extrakten, bei denen die Substratkonzentrationen konstant erhalten wurden, bewirkt Trenimon in intakten Zellen als Folge der NAD-Senkung eine Erniedrigung

der ATP-Konzentration [19]. Da die NSMN-Pyrophosphorylase durch ATP aktiviert wird [15, 29], (vgl. Tab. 1) und da ATP außerdem zur Bildung von PRPP benötigt wird, bewirkt ein Abfall der ATP-Konzentration eine Hemmung der NSMN-Synthese. Durch die Senkung des ATP-Spiegels wird neben der NSMN-Synthese auch die Bildung von NSAD aus NSMN und ATP sowie die ATP-abhängige Amidierung von NSAD zu NAD gehemmt. Zur Erklärung der in Fig. 5 dargestellten Erniedrigung der Radioaktivität des NSMN nehmen wir an, daß als Folge des ATP-Abfalles die Synthese von NSMN stärker gehemmt wird als der NSMN-Verbrauch, so daß die NSMN-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt wird, während die Senkung des ATP-Spiegels Verbrauch und Synthese von NSAD in etwa gleichem Maße beeinflußt und somit die NSAD-Konzentration nicht verändert. Unsere Erklärung gründet sich auf die Voraussetzung, daß unter den von uns benutzten Bedingungen die gemessenen Radioaktivitäten den Konzentrationen der entsprechenden Metaboliten proportional sind. Die Gültigkeit dieser Voraussetzung konnte für das NAD bewiesen werden (vgl. Fig. 5). Die Konzentrationen an NSMN und NSAD sind zu gering, um unter den benutzten Bedingungen gemessen werden zu können.

4. Biosynthesehemmung und Abbaubeschleunigung des NAD in Abhängigkeit von der Trenimon-Konzentration

Bei einer Konzentration von $2,2 \cdot 10^{-4}$ M bewirkt Trenimon sowohl eine Hemmung der Biosynthese als auch eine Beschleunigung des NAD-Abbaues. Für den raschen Abfall des NAD-Gehaltes der Tumorzellen ist ganz überwiegend die Abbaubeschleunigung verantwortlich. Da die benutzte Trenimon-Konzentration weit über der in vivo anwendbaren liegt, erschien es notwendig, zu prüfen, ob bei einer Erniedrigung der Dosis das Verhältnis zwischen abbaubeschleunigender und synthesehemmender Wirkung konstant bleibt.

Tab. 4 zeigt, daß in Abwesenheit von 5-Methylnicotinsäureamid der NAD-Gehalt auch bei der niedrigsten der angewandten Trenimon-Konzentrationen deutlich herabgesetzt wird. Eine Hemmung der NAD/NSAD-Pyrophosphorylase ist dagegen nur bei der höchsten Trenimon-Dosis von $2,2 \cdot 10^{-4}$ M nachweisbar. Der Einbau von Nicotinsäure ist bereits erniedrigt, wenn ein Einfluß auf die NAD/NSAD-Pyrophosphorylase noch nicht meßbar ist. Um auszuschließen, daß diese Einbauhemmung sekundär nach einem vorangegangenen NAD-Abbau als Folge eines dadurch bedingten ATP-Mangels eintritt, wurde der durch Trenimon bedingte NAD-Abfall mit Hilfe von 5-Methylnicotinsäureamid verhindert. Dieser Schutzeffekt des 5-Methylnicotinsäureamids beruht ebenso wie der schon länger bekannte des Nicotinsäureamids [31] auf einer Hemmung der NAD-Glykohydrolase [22]. Ein „Abfangen“ des Alkylie-

Tabelle 4. Einbau von ^{14}C -Nicotinsäure (^{14}C -NS) in NAD, NAD-Gehalt und NAD/NSAD-Pyrophosphorylase-Aktivität in Ehrlich-Ascites-Tumorzellen in Abhängigkeit von der Trenimon-Konzentration. Es wurde der in der Legende zu Fig. 1 beschriebene Inkubationsansatz benutzt. 5-Methylnicotinsäureamid (5-Me-NSA), Endkonzentration $5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ wurde jedoch nur dort zugegeben, wo es besonders angegeben ist. Die spezifische Radioaktivität der Nicotinsäure betrug im vorliegenden Versuch $27,9 \text{ mC/mMol}$

Test	Einbau von ¹⁴ C-NS in NAD				NAD-Gehalte %		NAD/ NSAD- Pyrophos- phorylase- Aktivität
	Ipm/ml Zellen · Std		Ipm/mμMol				mμMol NSAD Std · ml Zellen
		+ 5-MeNSA		+ 5-MeNSA		+ 5-MeNSA	
Kontrolle	184 · 10 ³	223 · 10 ³	590	718	100	100	1,01
+Trenimon 4,4 · 10 ⁻⁶ M	165 · 10 ³	202 · 10 ³	725	678	79	96	
+Trenimon 8,8 · 10 ⁻⁶ M	99 · 10 ³	215 · 10 ³	731	738	57	91	
+Trenimon 2,2 · 10 ⁻⁵ M	74 · 10 ³	186 · 10 ³	1000	741	29	81	1,00
+Trenimon 2,2 · 10 ⁻⁴ M	1,9 · 10 ³	88 · 10 ³	59	379	13	79	0,42

rungsmittels als Folge des starken Angebotes alkylierbarer Pyridinbasen konnte im Falle des Nicotinsäureamids bereits früher als mögliche Ursache des Schutzeffektes ausgeschlossen werden [3].

Tab. 4 zeigt, daß in Gegenwart von 5-Methylnicotinsäureamid eine Erniedrigung des Nicotinsäure-Einbaues bei Trenimon-Konzentrationen zwischen $2 \cdot 10^{-5}$ und 10^{-4} M meßbar wird. Im gleichen Konzentrationsbereich kommt es zu einer Hemmung der NAD/NSAD-Pyrophosphorylase, die bei $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ noch nicht nachweisbar ist, bei $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ Trenimon jedoch bereits 58% beträgt.

Aus den in Tab. 4 dargestellten Versuchsergebnissen ist zu schließen, daß eine unmittelbare Hemmung der NAD-Synthese nur durch Trenimon-Konzentrationen über $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ bewirkt wird. Der bei Trenimon-Konzentrationen unter 10^{-5} M zu beobachtende NAD-Abfall wird allein durch eine Abbaubeschleunigung verursacht. Die Abbaubeschleunigung bewirkt sekundär, wahrscheinlich über eine durch den NAD-Abfall bedingte ATP-Erniedrigung, eine Synthesehemmung.

Diskussion

Die vorliegenden Versuche zeigen, daß als Ursache des unter der Wirkung von Trenimon zu beobachtenden NAD-Abfalles eine Abbaubeschleunigung anzusehen ist. Ursache dieser Abbaubeschleunigung ist mit großer Wahrscheinlichkeit eine Aktivierung der NAD-Glykohydro-

lase. Nach einer Behandlung von Ascitestumorzellen mit alkylierenden Cytostatica in vivo läßt sich im zellfreien Extrakt der behandelten Zellen eine erhöhte NAD-Glykohydrolase-Aktivität nachweisen [5, 8]. Bei einer Inkubation in vitro mit Trenimon ist nach Aufschluß der Zellen eine Aktivierung jedoch nicht nachweisbar [22], obwohl auch unter diesen Bedingungen, wie die vorliegenden Befunde zeigen, eine Steigerung der Aktivität der NAD-Glykohydrolase anzunehmen ist. Vergleicht man die im zellfreien Extrakt meßbare Aktivität dieses Enzyms, die bei einer dem intracellulären Gehalt entsprechenden NAD-Konzentration 900 $\mu\text{Mol/Std} \cdot \text{ml}$ Zellen beträgt [25], mit der von uns gemessenen NAD-Synthese von 55 $\mu\text{Mol/Std} \cdot \text{ml}$ Zellen, so ist zu folgern, daß die NAD-Glykohydrolase in der Zelle weitgehend inhibiert sein muß. Unter der Wirkung von Trenimon erfolgt demnach eine intracelluläre Deinhibierung der NAD-Glykohydrolase. Der Mechanismus dieser Deinhibierung ist noch unklar. Von HILZ et al. [9] wird angenommen, daß die NAD-Glykohydrolase in der Zelle durch Nicotinsäureamid inhibiert sei. Röntgenstrahlen und Cytostatica sollen ein Auslaufen des Nicotinsäureamids aus den Zellen und als Folge davon eine Aktivierung der NAD-Glykohydrolase bewirken. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß unter dem Einfluß von Äthyleniminverbindungen zwar Nicotinsäureamid aus den Zellen in das Medium abgegeben wird, daß aber gleichzeitig der intracelluläre Nicotinsäureamid-Gehalt ansteigt [3, 4, 21]. Es ist daher unwahrscheinlich, daß der von HILZ et al. [9] vorgeschlagene Mechanismus die Ursache der Deinhibierung der NAD-Glykohydrolase ist.

Nach Aufschluß der Zellen findet sich der überwiegende Teil der NAD-Glykohydrolase in der sogenannten Mikrosomen-Fraktion. Es ist möglich, daß die intracelluläre Inhibierung des Enzyms mit der Struktur des endoplasmatischen Reticulums im Zusammenhang steht, und daß die Aktivierung die Folge einer Strukturschädigung der Zelle ist.

Die von uns gemessene turnover-Zeit des NAD in Ehrlich-Ascites-Tumorzellen von ca. 6 Std steht im Gegensatz zu früher angegebenen Werten aus dem hiesigen Institut [20] sowie zu Messungen von KLOMINSKY [17], der Umsatzzeiten von 10—45 min feststellte. Die genannten Autoren markierten das NAD mit ^{14}C -Ribose bzw. ^{14}C -Glucose und maßen anschließend die Abnahme der Radioaktivität des NAD. Eine Fehlermöglichkeit dieser Methode besteht darin, daß die ^{14}C -markierte Ribose des NAD über die sehr aktive NAD-Pyrophosphorylase schneller durch nicht markierte Ribose ersetzt wird als der Geschwindigkeit der „Schrittmacher-Enzyme“ der NAD-Synthese — der NMN- und NSMN-Pyrophosphorylase — entspricht. Es konnte gezeigt werden, daß die NAD-Pyrophosphorylase auch in der intakten Asciteszelle sowohl die Synthese als auch die Pyrophosphorolyse des NAD katalysiert [26]. Eine im AMP-Anteil des NAD lokalisierte Markierung setzt sich daher mit

dem Adennucleotid-Pool der Zelle ins Gleichgewicht und kann somit einen höheren NAD-turnover vortäuschen.

In den vorliegenden Versuchen konnte ein wesentlicher Einfluß des Trenimons auf den NAD-Stoffwechsel nur bei Konzentrationen festgestellt werden, die 1—2 Größenordnungen über den therapeutisch anwendbaren liegen. Dies bedeutet jedoch nicht, daß Trenimon bei therapeutischen Konzentrationen keinen Einfluß auf den NAD-Stoffwechsel besitzt. Untersuchungen von KRÖGER u. HOLZER [12] zeigen, daß einer einmaligen Injektion einer therapeutischen Dosis des alkylierenden Cytostaticums 2,5-Bis-n-propoxy-3,6-bis-äthylenimino-benzochinon-1,4 ein kontinuierlicher Abfall des NAD-Gehaltes von Tumorzellen innerhalb von 3 Tagen erfolgt. Die in dem von uns benutzten in vitro-System gemessenen Veränderungen des NAD-Stoffwechsels zeigen lediglich den Zustand am Ende der jeweiligen Inkubationszeit an und erlauben keine Aussage über das tatsächliche Ausmaß der Schädigung unter der benutzten Trenimon-Konzentration.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Badischen Landesverband zur Bekämpfung des Krebses und dem Bundesministerium für Wissenschaftliche Forschung danken wir für Beihilfen, die die vorliegende Arbeit ermöglicht haben.

Literatur

- [1] BANDEL, S., u. H. GRIMBERG: Unveröffentlichte Versuche.
- [2] BORST, P., H. GRIMBERG u. H. HOLZER: *Biochim. biophys. Acta* (Amst.) **74**, 785 (1963).
- [3] DUNTZE, W., H. W. GOEDDE, S. FRANK u. H. HOLZER: *Z. Krebsforsch.* **64**, 503 (1962).
- [4] FUSSGÄNGER, R.: Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Universität Freiburg i.Br. 1966
- [5] GREEN, S., and O. BODANSKY: *J. biol. Chem.* **237**, 1752 (1962).
- [6] GRUNICKE, H., M. LIERSCH, H. HOLZER, and H. ARNOLD: *Biochem. Pharmacol.* **14**, 1485 (1965).
- [7] — — M. HINZ, B. PUSCHENDORF, E. RICHTER, and H. HOLZER: *Biochim. biophys. Acta* (Amst.) (im Druck).
- [8] HILZ, H., W. ERBE u. J. PREISS: Tagung Ges. Physiol. Chemie, Berlin 1965; zit. *Z. klin. Chem.* **3**, 7 (1965).
- [9] — — P. HLAVICA u. B. BERTRAM: *Biochem. Z.* **338**, 283 (1963).
- [10] HINZ, M.: Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Universität Freiburg i.Br. 1966.
- [11] HOLZER, H., P. GLOGNER u. G. SEDLMAYR: *Biochem. Z.* **330**, 59 (1958).
- [12] —, u. H. KRÖGER: *Biochem. Z.* **330**, 579 (1958).
- [13] —, u. G. SEDLMAYR: *Ber. ges. Physiol.* **189**, 120 (1957).
- [14] IMSANDE, J.: *J. biol. Chem.* **236**, 1494 (1961).
- [15] —, and P. HANDLER: *J. biol. Chem.* **236**, 525 (1961).
- [16] — — In: *The Enzymes*, ed. by BOYER, P. D., H. LARDY and K. MYRBÄCK, Vol. 5, p. 281. New York, London: Academic Press 1961.
- [17] KLOMINSKY, U.: Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen 1964.

- [18] KOERNER, J. M., and R. L. SINSHEIMER: J. biol. Chem. **228**, 1048 (1957).
- [19] KRÖGER, H., et H. HOLZER: Extrait de Acta Union Intern. Contre le Cancer **16**, 686 (1960).
- [20] — H. W. ROTHHAUWE, B. ULRICH u. H. HOLZER: Biochem. Z. **333**, 148 (1960).
- [21] — — — Biochem. Z. **333**, 155 (1960).
- [22] KUN, E., B. LANGER, B. ULRICH, H. HOLZER, and H. GRUNICKE: Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **52**, 1501 (1964).
- [23] LAMBOURG, M., F. E. STOLZENBACH, and N. O. KAPLAN: J. biol. Chem. **231**, 685 (1958).
- [24] LANGAN, T. A., N. O. KAPLAN, and L. SHUSTER: J. biol. Chem. **234**, 2161 (1959).
- [25] LANGER, B.: Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Universität Freiburg i.Br. 1965.
- [26] LIERSCH, M.: Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Universität Freiburg i.Br. 1966.
- [27] NETTER, H.: Theoretische Biochemie, S. 548. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1959.
- [28] PREISS, J., and P. HANDLER: J. biol. Chem. **233**, 488, 493 (1958).
- [29] PUSCHENDORF, B.: Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Universität Freiburg i.Br. 1966.
- [30] RICHTER, E.: Unveröffentlichte Versuche.
- [31] ROITT, J. M.: Biochem. J. **63**, 300 (1956).
- [32] SCRIBA, P.: Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Universität Freiburg i.Br. 1959.
- [33] — S. SCHNEIDER u. H. HOLZER: Z. Krebsforsch. **63**, 547 (1960).
- [34] WARBURG, O., u. W. CHRISTIAN: Biochem. Z. **287**, 291 (1936).
- [35] ZILVERSMIT, D. B., C. ENTENMAN, and M. C. FISHLER: J. gen. Physiol. **26**, 325 (1943).

Prof. Dr. H. HOLZER
Biochemisches Institut der Universität
78 Freiburg i.Br.,
Hermann Herder-Straße 7

Lebenslauf

Am 20. Juli 1942 wurde ich als Sohn des Reichsbahninspektors Richard Puschendorf und seiner Ehefrau Margarete geb. Waschow in Berlin geboren. In Berlin besuchte ich vom Herbst 1948 bis Ostern 1952 die Volksschule und anschließend bis Herbst 1954 die 1. Oberschule, wissenschaftlicher Zweig. Nach Übersiedlung nach Konstanz war ich Schüler des Heinrich-Suso-Gymnasiums bis zum Herbst 1955. Infolge dienstlicher Versetzung meines Vaters zogen wir nach Freiburg i. Br., wo ich meinen Schulbesuch auf dem Berthold-Gymnasium fortsetzte und im Frühjahr 1961 das Abitur ablegte.

Zum Sommersemester 1961 wurde ich an der Medizinischen Fakultät der Universität Freiburg im Breisgau immatrikuliert, wo ich nach dem Wintersemester 1961/62 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und nach dem Sommersemester 1963 die ärztliche Vorprüfung bestand.

Nach der ärztlichen Vorprüfung setzte ich mein Studium an der Universität Freiburg im Breisgau fort. Zum Ende dieses Sommersemesters 1966 habe ich meine Zulassung zur ärztlichen Prüfung beantragt.

